

ЗАЙНУТДИНОВА ЭЛЬМИРА ФАРИТОВНА

**АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ В КОМБИНАЦИИ С  
«БЕТАДИНОМ» НА КЛЕТКИ ОРГАНИЗМОВ РАЗЛИЧНЫХ  
ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
**Филимонова Мария Николаевна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Чернова Ольга Александровна**  
(ведущий научный сотрудник ФГБУН  
«Казанский институт биохимии и  
биофизики Казанского научного центра РАН»)

доктор ветеринарных наук, профессор,  
**Галиуллин Альберт Камилович**  
(ФГБОУ ВПО «Казанская государственная  
академия ветеринарной медицины  
им. Н. Э. Баумана», заведующий кафедрой  
микробиологии и вирусологии факультета  
ветеринарной медицины»)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение «Федеральный центр  
токсикологической, радиационной и  
биологической безопасности» (г. Казань)

Защита состоится «28» ноября 2013 г. в 13 ч. на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, аудитория №211.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н. И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан « 25 » октября

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор

Абрамова З.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Неуклонный рост устойчивости микроорганизмов к антибактериальным средствам, трудности лечения и профилактики инфекционных заболеваний, обусловленные появлением мультирезистентных форм патогенов, их биологическим разнообразием, а также возникновением новых видов инфекций, определяют актуальность поиска и создания новых противомикробных средств и находятся в фокусе пристального внимания мирового сообщества. Возможность летального исхода от любой банальной инфекции в силу неэффективности традиционной терапии все чаще обращает внимание исследователей к соединениям нового типа и их комбинированию с известными средствами с целью получения высокого фармакотерапевтического эффекта (Аляутдин Р. Н. и др. Молекулярная медицина. 2003. С. 41-44). Примером тому может служить внеклеточная эндонуклеаза грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens*, проявляющая целый ряд биологических эффектов, механизмы которых до конца не познаны (Беляева М. Н. Микробиология. 1977. Т. 46. С. 300-304; Габдуллина Г. К. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. 1980. 25 с.; Салганик Р. И. и др. Ветеринария. 1985. № 5. С. 42 - 44; Куриненко Б. М. и др. Нуклеазы бактерий. 1991. С.153-230).

Представляя собой дезоксирибонуклеат (рибонуклеат) – 5'-нуклеотидогидролазу и выделяясь в ряду аналогичных ферментов чрезвычайно высокой гидролитической активностью по отношению к высокомолекулярным ДНК и РНК, эндонуклеаза служит реактивом для молекулярно-биологических исследований, а также применяется в пчеловодстве в качестве противовирусного препарата (Панфилова З. И. и др., 1982. С. 100; Детиненко Л. Д. и др. Патент на изобретение № 2038776.1995; Kalyuzhny A. Handbook of ELISPOT. Methods and Protocols. 2005. 336 p.). Изучение ее противовирусного эффекта показало перспективность использования не только при болезнях вирусной этиологии пчел, но и животных (Аликин Ю. С. и др. Сб. Докл. 1998. С.152 -163).

Комбинирование эндонуклеазы с «Йодохлорином» - эффективным дезинфектантом, представляющим йодсодержащий электроактивированный солевой раствор приводило не только к возрастанию противовирусной активности (Филимонова М. Н. и др. Патент на изобретение №2337139. 2006), но и к расширению спектра действия фермента, вероятно за счет взаимодополнения механизмов и мишеней действия. Созданная принципиально новая композиция представляла практический интерес, так как отличалась высокой вирулицидной и микробоцидной активностью без выраженной видоспецифичности и была активна при мягких физиологических условиях (Филимонова М. Н. и др. Сб. Докл. 2009. С. 287-289).

Несмотря на массу положительных качеств «Йодохлорина»: безвредность для эукариот, отсутствие отрицательного влияния на пассивный и поствакцинальный иммунитет (Фаткуллова А. А. и др. Мат. Всеросс. н. п. конфер. 2005. С. 393-395), способность к самоинактивации (Угрюмова В. С. и др. Ветеринарный врач. 2001. - №. 3. - С. 59), образование пор в результате контакта с клеточными мембранами и т.д., - значительное снижение каталитической активности эндонуклеазы даже при ее кратковременном прямом контакте с «Йодохлорином» стало основной причиной создания новой аналогичной композиции, где роль йодсодержащего реагента отводилась повидон-йоду в составе средства «Бетадин». Известно, что «Бетадин» находит широкое применение в медицине, производится фармацевтической промышленностью и обладает идентичным «Йодохлорину» механизмом и широким спектром действия (William A. et al. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. 2008. С. 51-52; Alps R. Povidone Iodine Antiseptic Agent. 2004. Р. 7-26). Есть сведения об эффективности его применения для профилактики вторичного опухолевого роста при проведении абдоминальных операций на животных (Tsunoda A. et al. Europ. surg. research. J. 1997. Р. 473-480, Anticancer research J. 1999. Р.1149-1152; Sindelar W.F. et al. Hosp Infect. J. - 1985. Р.103-104).

Таким образом, изложенное обосновывает **актуальность** исследования, **цель** которого состояла в оценке антибактериального, противовирусного, антимикотического и противоопухолевого эффекта эндонуклеазы *Serratia marcescens* в комбинации с «Бетадином».

В связи с поставленной целью решали следующие **задачи**:

1. Провести сравнительный анализ эффективности действия эндонуклеазы на бактерии, вирусы, дрожжи и культуру клеток гепатомы.
2. Оценить эффективность действия растворов «Бетадина», различающихся содержанием повидон-йода, на бактерии, вирусы, дрожжи и культуру клеток гепатомы в зависимости от условий среды и физиологического состояния организмов.
3. Подобрать условия эффективного действия эндонуклеазы в комбинации с «Бетадином» на организмы разных таксономических групп.

**Научная новизна.** Впервые исследовано влияние мономеров гомогенной эндонуклеазы на жизнеспособность организмов различных таксономических групп: вирусы (фаг  $\lambda$  bII), бактерии грамотрицательные (*Serratia marcescens*) и грамположительные (*Bacillus subtilis*), низшие эукариоты (дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*), а также высшие эукариоты (культура клеток гепатомы Н4-П-Е-С3) и установлено снижение жизнеспособности всех исследованных объектов кроме культуры клеток гепатомы. Показано, что подавляющее действие эндонуклеазы не зависит от типа молекулярной формы фермента. Впервые

установлена возможность комбинирования эндонуклеазы и «Бетадина» и показано, что после их прямого 6 мин контакта сохраняется не менее 30% ферментативной активности независимо от типа изоформы. Исследовано изменение морфологии и ультраструктуры бактериальных клеток под действием «Бетадина» и выявлено нарушение мембранных структур, цитоплазмы и ядерного материала. Впервые продемонстрирована эффективность действия «Бетадина» в щелочной среде и показано, что 1% «Бетедин» вызывает полное подавление роста и жизнеспособности всех исследованных организмов, кроме культуры клеток гепатомы. Показано, что в результате комбинированного действия эндонуклеазы и «Бетадина» подавление жизнеспособности всех исследованных организмов усиливается. Подобраны условия 100% подавления жизнеспособности культуры клеток гепатомы Н4-П-Е-С3.

**Практическая значимость.** Настоящим исследованием показана перспективность использования эндонуклеазы *Serratia marcescens* в комбинации с йодофором «Бетедин» - препаратов, относящихся к разным классам соединений - для повышения эффективности подавляющего действия эндонуклеазы широкого спектра, что является основой для создания универсального средства защиты от инфекций различной этиологии в разных отраслях народного хозяйства. Полное подавление жизнеспособности клеток культуры гепатомы Н4-П-Е-С3 под действием эндонуклеазы в комбинации с «Бетадином» открывает перспективу применения данной композиции в онкологии для предотвращения вторичного роста раковых опухолей при проведении абдоминальных операций.

**Основные научные положения, выносимые на защиту:**

1. Прямой контакт клеток про- и низших эукариот с мономерами гомогенной эндонуклеазы приводит к снижению жизнеспособности культуры.
2. Растворы «Бетадина» с содержанием повидон-йода 0.002% вызывают подавление жизнеспособности организмов за счет нарушений в мембранных структурах, цитоплазме и ядерном материале.
3. В результате прямого 6 мин контакта эндонуклеазы с «Бетадином» происходит не полное, а лишь частичное снижение ферментативной активности; остаточная активность составляет не менее 30% независимо от типа изоформы.
4. Комбинирование эндонуклеазы с разбавленным «Бетадином» увеличивает ее эффективность действия на организмы, относящиеся к разным таксономическим группам.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы Были представлены на Первой межуниверситетской конференции по современной биологии «Bionews» (Kazan, 2008); X Научной конференции

молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2011).

**Публикация результатов исследований.** По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в числе которых 1 патент, 3 статьи (ВАК), 2 тезисов.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н., ведущему научному сотруднику кафедры микробиологии М. Н. Филимоновой за постановку проблемы, и неоценимую помощь на всех этапах работы; профессору ИБФМ РАН В. В. Дмитриеву, профессору А. И. Голубеву, доценту Р. М. Сабирову, к.б.н. В.Г. Евтюгину (Казанский (Приволжский) Федеральный университет) за помощь при проведении электронно-микроскопического анализа, к.б.н. Е. Науменко и заведующей кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) Федерального университета д.б.н., профессору, академику АН РТ О. Н. Ильинской за предоставленную возможность и помощь, оказанную при проведении исследований на культуре клеток гепатомы, другу и соратнику И. А. Рассохиной за совместное исследование противовирусной активности, а также к.б.н., старшему научному сотруднику А. И. Колпакову и всем сотрудникам кафедры за всестороннюю поддержку.

**Структура и объем диссертационной работы.** Диссертация изложена на 136 страницах и включает в себя: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы (275 источник, в том числе 125 иностранных). Диссертация содержит 4 таблицы и 35 рисунков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**В исследовании использовали** грамположительные бактерии *B. subtilis* JH 642, граммотрицательные бактерии *S. marcescens* W 1050, любезно предоставленные профессором М. Бенедиком (США), дрожжи *S. cerevisiae*, полученные из коллекции чистых культур кафедры микробиологии КПФУ, систему фаг/хозяин, включающую бактерии *E. coli* BL21(DE3)pLysS и бактериофаг  $\lambda$  bII, полученные от профессора Королевского университета сельского хозяйства Дании Ю. Джозефсен, а также клеточные линии гепатомы крысы (H4-II-E-C3) из Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC, США), «Бетадин» - коммерческий препарат для наружного применения, содержащий 10% повидон-йод (Egis Pharmaceutical, Венгрия). В работе использовали ранее выделенные и охарактеризованные лиофильно высушенные препараты эндонуклеазы бактерий *S. marcescens*, которые растворяли в 0.1 М Трис-HCl буфере, pH8.5, и разделяли гелехроматографией на колонке с сефадексом G-100 на мономеры и олигомеры. Препарат

изоформы Sm1 с активностью 25536 Ед./мл применяли при определении влияния эндонуклеазы в отдельности и в комбинации с «Бетадином» на жизнеспособность вирусов  $\lambda$  bII и бактерий *S. marcescens*. В остальных случаях использовали гомогенные препараты эндонуклеазы с активностью 257600 Ед./мл и 228800 Ед./мл, содержащие практически в равных количествах изоформы Sm1 и Sm2. Определение нуклеазной активности проводили методом кислоторастворимых фракций согласно рекомендациям (Лещинская И. Б. и др. Биохимия. 1974. - Т. 39. - №1 – С. 116 – 122).

***S. marcescens* и *B. subtilis* выращивали на среде**, включающей (г/л): панкреатический гидролизат кильки-10.05, NaCl - 4.95, и при необходимости 2.5 % агара. *S. cerevisiae* выращивали на среде Сабуро, *E. coli* - на среде LB (Sigma, США) с 0.005% ампициллином при необходимости дополненной 2% или 0.8% агаром. Культуру клеток гепатомы выращивали в CO<sub>2</sub> - инкубаторе (с 5 %-ным CO<sub>2</sub>) 3 суток при 37°C в модифицированной по способу Дульбекко ростовой питательной среде Игла (DMEM; Sigma-Aldrich, США) содержавшей дополнительно 10% FBS – эмбриональной телячьей сыворотки и раствора антибиотиков, включающего 10 000 Ед./мл пенициллина G и 10 мг/мл стрептомицина сульфата (Bottenstein et al. Methods in Enzymology. 1979).

**Жизнеспособность *S. marcescens*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*** оценивали прямым подсчетом числа КОЕ, полученных посевом микробных суспензий на твердые питательные среды. Жизнеспособность фагов оценивали прямым подсчетом числа негативных колоний, полученных по методу Грациа (Габрилович И. Г. Методы получения и определения бактериофагов. 1968. с.79). Для оценки жизнеспособности культуры клеток гепатомы применяли метод двойного окрашивания в системе «живой/мертвый», используя набор Live/Dead Cell Viability Kit (Fluka, Швейцария), в ходе которого 10 мкл 5 мкМ ацетоаксиметилового эфира кальцеина (Calcein-AM) и 5 мкл 5 мкМ пропиций-йодида смешивали с 5 мл натрий-фосфатного буфера, pH 7.0, (PBS) и добавляли по 0.2 мл к исследуемой культуре клеток, предварительно проинкубированной с тестируемыми соединениями и затем промытой 1 раз PBS. После 15 мин инкубации при 37 ° C окрашенные клетки фиксировали 20 мин с помощью 4% параформальдегида и промывали 1 раз PBS. Количественную оценку живых, мертвых и поврежденных клеток проводили прямым подсчетом каждой из флюоресцентных меток не менее чем в 300 клетках опухоли и не менее чем в 10 полях зрения с помощью флюоресцентного микроскопа AxioVision (Carl Zeiss, Германия) при длине волны возбуждения 490 nm.

**Изменение морфологии и ультраструктуры клеток *S. marcescens*** под действием «Бетадина» или эндонуклеазы в сочетании с «Бетадином» определяли с помощью электронного микроскопа JEM-100CX (JEOL, Япония) при увеличении 28000 и 40000 раз. Для этого бактериальную суспензию (ОП

= 0.46 ед./мл) смешивали с равным объёмом водного раствора «Бетадина», содержавшего 0.002 % повидон-йода, или его смеси с буферным раствором эндонуклеазы. После 15 сек инкубации добавляли 3-х кратным объемом 10% глутарового альдегида в 0.2 М какодилатном буфере, рН 7.2, и инкубировали 30 мин при 8 °С. Затем биомассу отделяли центрифугированием и продолжали подготовку по общепринятой классической схеме (Уикли, Электронная микроскопия для начинающих. 1975. с. 324.), фиксируя в 2.5 % глутаровом альдегиде, затем в 2%-ном растворе OsO<sub>4</sub>. Далее проводили дегидратацию этанолом и пропитывали смолами: Epon 812, DDDSA, NNA, DMP 30. Полимеризовали образцы в течение 2 суток сначала при 37° - , а затем при 60° С. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме «Ultratom 3» (ЛКБ, Швеция). Срезы контрастировали 4% уранилацетатом в 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН и цитратом свинца.

**При определении влияния эндонуклеазы** на жизнеспособность вирусов вирусную суспензию смешивали с равным объёмом раствора эндонуклеазы с активностью 10000 Ед./мл в 0.1 М Трис-НСl буфере, рН8.5, содержащем 0.01 М Mg<sup>2+</sup>, и инкубировали, за исключением опытов по влиянию времени инкубации, 6 мин при комнатной температуре. Затем определяли жизнеспособность. Бактериальную суспензию (ОП = 0.056 ед./мл) или суспензию дрожжей (ОП= 0.07 ед./мл) смешивали с равным объёмом буферного раствора эндонуклеазы и инкубировали 20 мин при исследовании *S.marcescens*, 30 мин – *B.subtilis*, а также 15 и 30 мин – *S. cerevisia*. Здесь и далее инкубация с эндонуклеазой проходила при 4-8° С. При оценке влияния на жизнеспособность культуры клеток гепатомы 0.2 М Трис-НСl буфера, рН 8.5, содержащего 0.02 М Mg<sup>2+</sup> или эндонуклеазы к культуре клеток добавляли по 0.2 мл/лунку буфера или буферного раствора эндонуклеазы с активностью 6440 Ед./мл, 1288 Ед./мл или 12.88 Ед./мл, инкубировали 15 мин и оценивали жизнеспособность.

**При определении влияния «Бетадина»** на жизнеспособность вирусов вирусную суспензию смешивали с равным объёмом водного раствора «Бетадина» и инкубировали 6 мин в темноте при комнатной температуре. Затем определяли жизнеспособность. При определении зависимости антивирусного эффекта от времени инкубации, инкубацию проводили при 8-12° С. При определении действия «Бетадина» на жизнеспособность *S.marcescens*, а также влияния на эффективность действия присутствия в инкубационной среде, количества повидон-йода, времени инкубации, плотности бактериальной суспензии или фазы роста культуры, «Бетадин» или его раствор смешивали с равным объёмом бактериальной суспензии или культуры, инкубировали 10-15 сек или 30 мин в темноте при комнатной температуре, после чего определяли жизнеспособность. Бактериальную суспензию *B.subtilis* (ОП = 0.056 ед./мл) смешивали с равным объёмом



раствора «Бетадина» до содержания повидон-йода, соответственно, 0.01-0.04%. После 35 мин инкубации оценивали жизнеспособность культуры. Суспензию дрожжей (ОП= 0.07 ед./мл) смешивали с равным объёмом неразбавленного (10%) или водного раствора «Бетадина», включавшего 1.0 – 0.01% повидон-йода, инкубировали 15 сек или 3 мин при 25-28°C, а затем оценивали жизнеспособность. К культуре клеток гепатомы добавляли по 0.2 мл/лунку раствора «Бетадина», полученного разбавлением 0.5 % NaCl или стерильной дистиллированной водой и включавшего, соответственно, 1 или 0.005 % повидон-йода. После 6 мин инкубации проводили окрашивание по стандартной методике.

**При определении влияния эндонуклеазы в комбинации с «Бетадином»** на жизнеспособность вирусов к вирусной суспензии добавляли в равном объеме смесь водного раствора «Бетадина», содержавшего 0.0001% повидон-йода, и буферного раствора эндонуклеазы с активностью 10 000 Ед./мл, которые предварительно смешали в равных частях. После 6 мин инкубации определяли жизнеспособность. Суспензию бактерий *S.marcescens* (ОП = 0.056 ед./мл) смешивали с равным объёмом композиции, составленной из равных частей буферного раствора эндонуклеазы с активностью 6384 Ед./мл и водного раствора «Бетадина», содержавшего 0.002; 0.01; 0.02 или 0.025 % повидон-йода, инкубировали 20 мин. Суспензию бактерий *B.subtilis* (ОП = 0.056 ед./мл) смешивали с равным объёмом композиции, составленной из равных частей буферного раствора эндонуклеазы с активностью 11 440 Ед./мл или 1 144 Ед./мл и водного раствора «Бетадина», содержавшего 0.02 % повидон-йода, инкубировали 20 мин. Суспензию дрожжей (ОП = 0.07 ед./мл) смешивали с равным объёмом водного раствора «Бетадина», содержавшего 0.02 % повидон-йода, инкубировали 6 мин, затем смешивали с равным объёмом буферного раствора эндонуклеазы с активностью 5720 Ед./мл или 1 144 Ед./мл, и инкубировали 15- или 30 мин. Анализируя комбинированное действие эндонуклеазы и «Бетадина», культуру клеток гепатомы подвергали прямому контакту, как с предварительно подготовленной смесью разбавленного «Бетадина» и раствора эндонуклеазы в 0.2 М Трис-НСl-буфере, рН 8.5, содержавшего 0.02 М  $Mg^{2+}$ , так и их последовательно сочетанному действию. Активность эндонуклеазы до смешивания с культурой клеток составляла 6440 ед./мл, 1288 ед./мл или 12.88 ед./мл. Для оценки влияния комбинированного препарата к культуре клеток добавляли по 0.2 мл/лунку смеси, составленной из равных частей буферного раствора эндонуклеазы и раствора «Бетадина», полученного разбавлением 0.5 % NaCl или стерильной дистиллированной водой и включавшего, соответственно, 1 или 0.005 % повидон-йода. После 15 мин инкубации определяли жизнеспособность по стандартной методике. Для оценки последовательно сочетанного действия «Бетадина» и эндонуклеазы и зависимости эффекта от содержания повидон-

йода и ферментативной активности к культуре клеток добавляли по 0.2 мл/лунку раствора «Бетадина», полученного, как описано. Затем после 6 мин инкубации добавляли по 0.2 мл/лунку буферного раствора эндонуклеазы и инкубировали 15 мин.

**При определении действия «Бетадина» на активность эндонуклеазы** водные или буферные растворы изоформ Sm1 или Sm2 эндонуклеазы смешивали в равных частях с 10% или разбавленным «Бетадином», инкубировали 3 мин, 6 мин и определяли ферментативную активность. За 100% принимали активность до инкубации.

**Статистическая обработка результатов** проводили с помощью подпрограммы статистического анализа графической программы Sigma plot 8.1 и программы Microsoft Excel для доверительного интервала 95%. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием параметрических (оценка достоверности разности  $t_d$ , критерий Стьюдента с поправкой Бонферонни для множественного сравнения). Уровень значимости  $p=0.05$  принимали достаточным для достоверной разницы групп данных. Использовали принципы обработки результатов изучения инактивирующего действия на фаги физических и химических агентов согласно руководствам Бейли (1963) и П. Ф. Рокицкого (1967).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Исследование эффективности действия гомогенной эндонуклеазы**

Для исследования эффективности действия эндонуклеазы колоночной хроматографией в разработанных ранее условиях (Галиева Г. М. и др. Учен.зап. Казан. Ун-та. 2011. Т. 153, кн. 2. С.41-50) была выделена фракция мономеров из гомогенных препаратов изоформы Sm1 и смеси изоформ Sm1 и Sm2.

Исследование антивирусной активности эндонуклеазы выявило прямую зависимость от величины ферментативной активности в интервале 100 - 100 000 Ед./мл (рис. 1). Наилучший антивирусный эффект – уменьшение жизнеспособности почти в 2 раза - наблюдали при использовании препарата с активностью 100 000 Ед./мл.

Изменение продолжительности инкубации с фаговой суспензией выявило прямую зависимость антивирусного эффекта эндонуклеазы от времени инкубации (рис. 2). Так, через 6 мин инкубации жизнеспособность суспензии сокращалась почти на 40%, через 1 ч – больше, чем в 2 раза, через 6 ч – почти в 7 раз, а через сутки наблюдали полную утрату жизнеспособности. Изменение плотности фаговой суспензии в 10 раз не влияло на результат действия эндонуклеазы. Напротив, возрастание ионной силы за счет 5-кратного увеличения содержания Триса увеличивало эффективность действия

эндонуклеазы, вызывая достоверное снижение жизнеспособности суспензии почти на 10%.

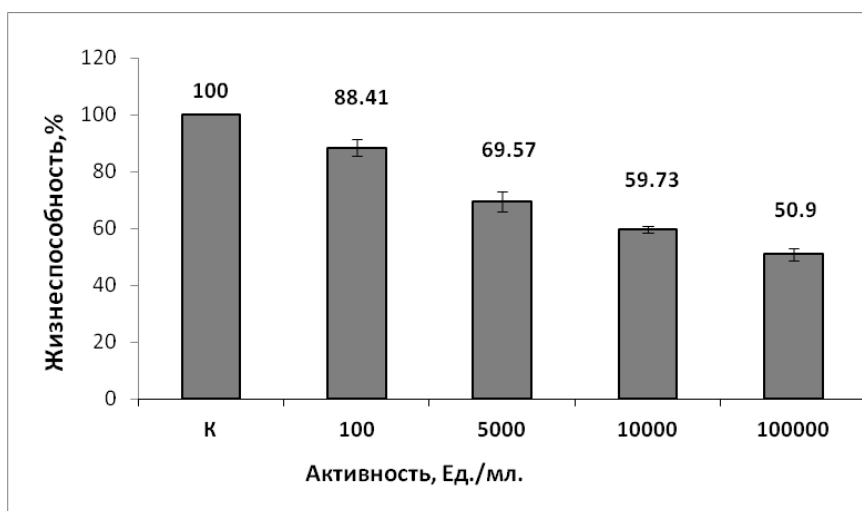


Рис. 1. Изменение жизнеспособности фаговой суспензии под действием эндонуклеазы

Таким образом, гомогенная эндонуклеаза, проявляла выраженную антивирусную активность, величина которой зависела от величины ферментативной активности, продолжительности контакта вирусов с ферментом, и не зависела от плотности вирусной суспензии.

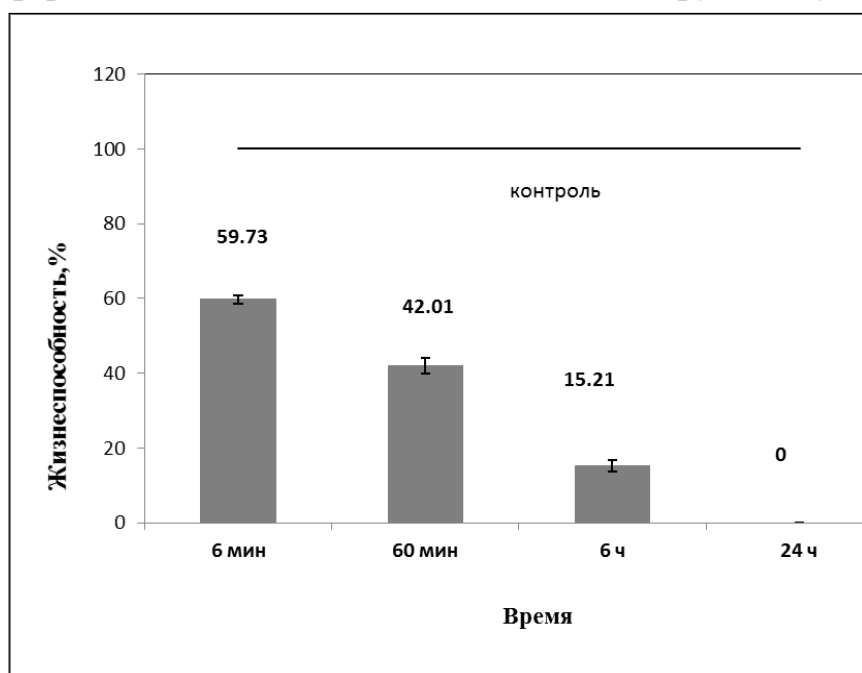


Рис. 2. Зависимость эффективности действия эндонуклеазы от продолжительности инкубации

Анализ действия эндонуклеазы на *S. marcescens* показал, что независимо от типа молекулярной формы фермента происходило подавление жизнеспособности культуры, слабо зависящее от ферментативной активности (рис. 3)

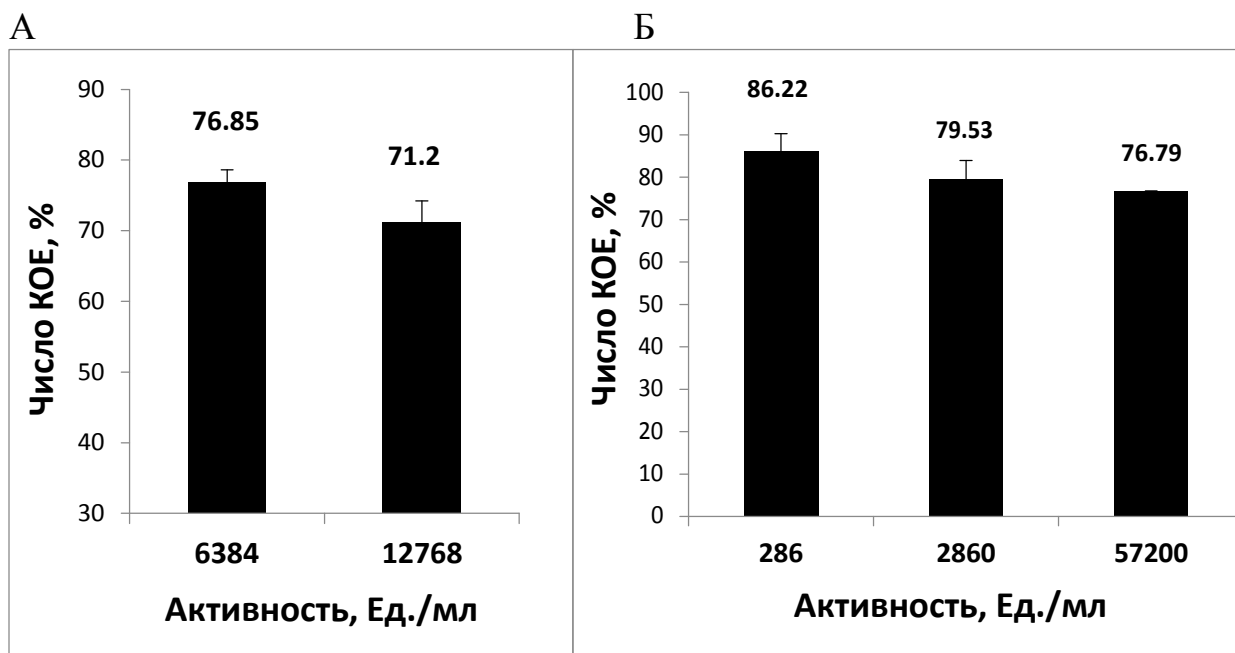


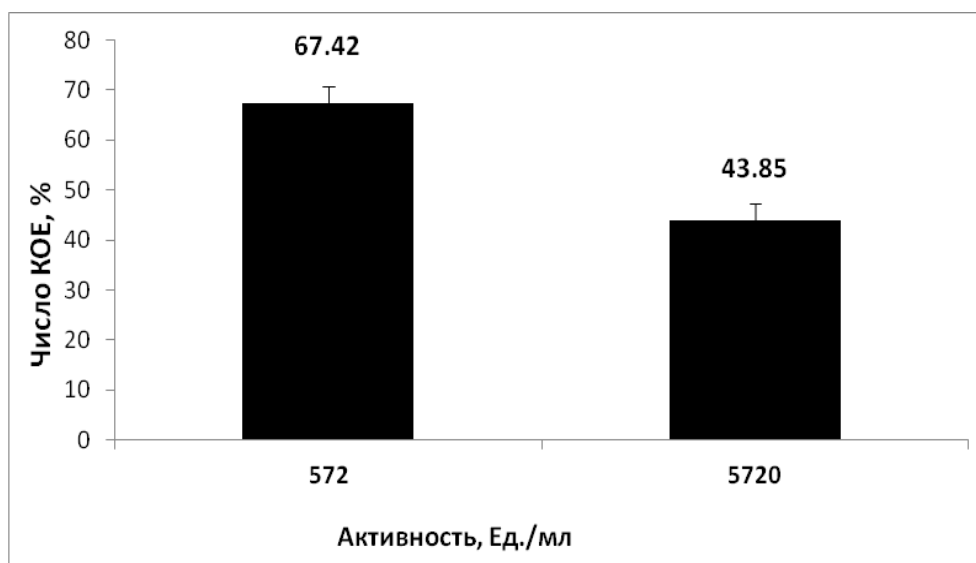
Рис. 3. Изменение жизнеспособности бактериальной суспензии *S. marcescens* под действием изоформы Sm1 (А) и смеси изоформ Sm1 и Sm2 (Б) в зависимости от ферментативной активности

Поскольку на примере энтеробактерий установлено, что подавление жизнеспособности не зависит от типа молекулярной формы эндонуклеазы, в дальнейших исследованиях использовали смесь изоформ Sm1 и Sm2.

Анализ действия эндонуклеазы на *B.subtilis* выявил достоверную зависимость эффекта подавления жизнеспособности от ферментативной активности, что служило сходством с антивирусной активностью и отличием от эффекта подавления жизнеспособности грамотрицательных бактерий. В частности, в результате 30-минутной инкубации бацилл с эндонуклеазой, активность которой составляла 572 или 5720 Ед./мл, соответственно, жизнеспособность культуры сокращалась более чем на 30 или 50 % (рис. 4 А).

Аналогично, под действием эндонуклеазы происходило подавление жизнеспособности дрожжей *S.cerevisiae* (рис. 4 Б), которое зависело как от ферментативной активности, так и времени инкубации. Так после 30 мин инкубации в присутствие эндонуклеазы с активностью 1144 Ед./мл, жизнеспособность культуры снижалась почти в 2 раза. При увеличении активности в пять раз жизнеспособность культуры уменьшалась почти на 10%. Сокращение времени инкубации в 2 раза повышало жизнеспособность культуры почти на 10 % тогда, когда активность составляла 5720 Ед./мл.

А



Б

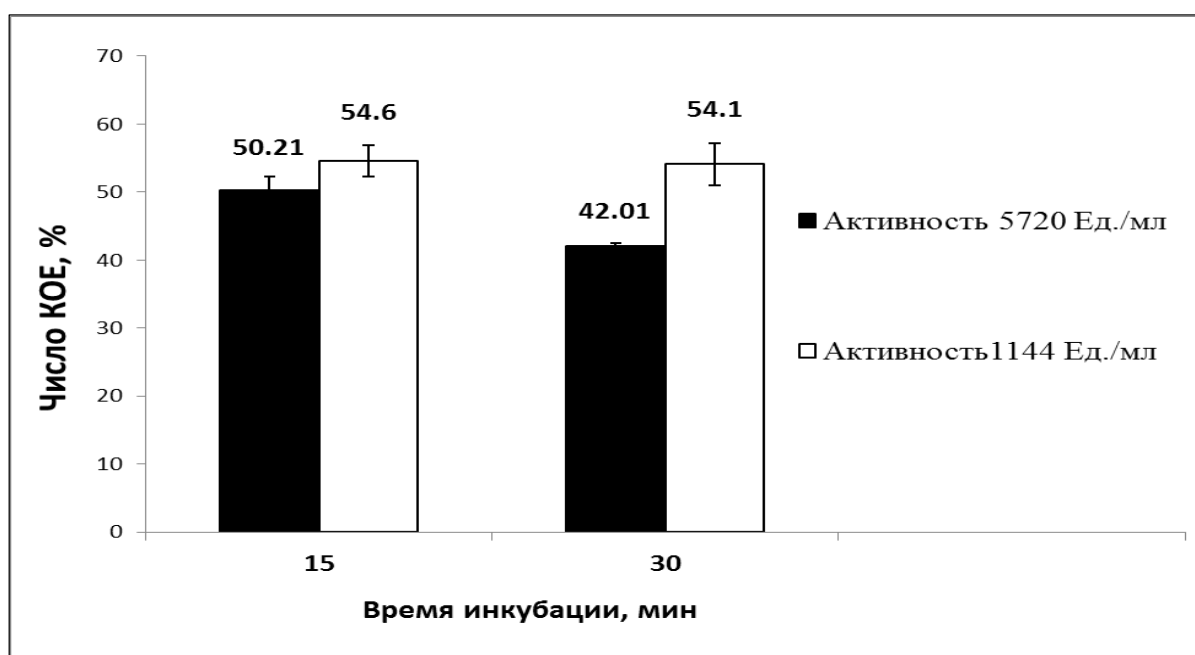


Рис. 4. Изменение жизнеспособности клеточной суспензии *B.subtilis* (А) и *S.cerevisiae* (Б) под действием эндонуклеазы

В отличие от микроорганизмов эндонуклеаза не оказывала влияния на жизнеспособность культуры клеток гепатомы, в которой почти 9% клеток были нежизнеспособны: мертвые или поврежденные, - и отличались от преобладающего большинства клеток, окрашенных в зеленый цвет, красной флюоресценцией в области ядра или цитозоля (рис. 5). Картина оставалась прежней, после 15 мин инкубации культуры клеток с 0.2 М Трис-НСl буфером, рН 8.5, содержащим 0.02 М  $Mg^{2+}$  или с буферными растворами эндонуклеазы, различающимися ферментативной активностью.

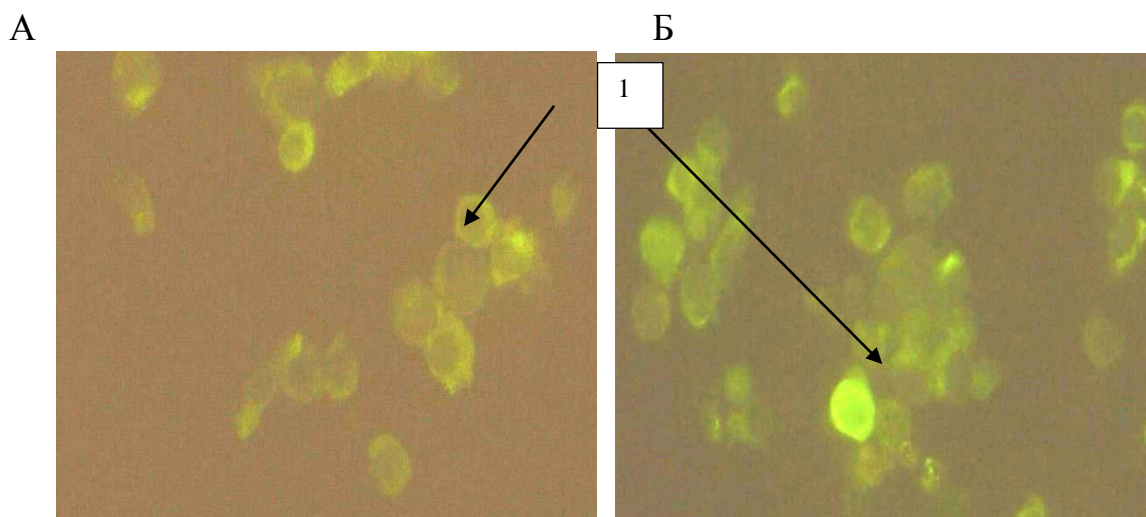


Рис. 5. Культура клеток гепатомы Н4-П-Е-С3 до (А) и после (Б) инкубации с буферным раствором эндонуклеазы с активностью 6440 Ед./мл.

1 - затемненная область ядерного материала

## 2. Оценка эффективности действия растворов «Бетадина»

При оценке эффективности действия растворов «Бетадина» на вирусы, была установлена прямая зависимость эффективности антивирусного действия «Бетадина» от концентрации активного вещества (рис. 6). Так, 100%-ный антивирусный эффект, проявлявшийся полной утратой жизнеспособности фагов, получали в контакте с растворами «Бетадина», содержащими, соответственно, 10 или 1% повидон-йода. Снижение содержания повидон-йода до 0.1 - 0.00001% приводило к частичному сохранению жизнеспособности фаговой суспензии, которая, соответственно, составляла 50-85 % от исходной.

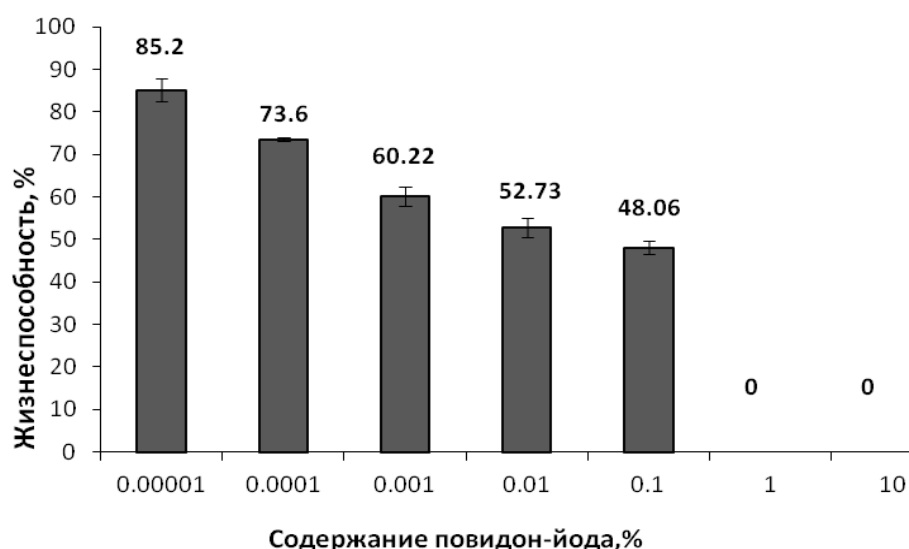


Рис. 6. Изменение жизнеспособности фагов под действием растворов «Бетадина»

Увеличение плотности вирусной суспензии в 10 раз не оказывало существенного влияния на эффективность действия 0.1% раствора «Бетадина».

Напротив, увеличение времени инкубации фаговой суспензии с «Бетадином», приводило к усилению антивирусного эффекта. Так, в результате 6 мин инкубации, (рис. 7), число жизнеспособных фагов суспензии уменьшалось почти на 25%, через 1 ч - дополнительно на 20%, через 6 ч – более чем на 80%, а через сутки наблюдали полную утрату жизнеспособности.

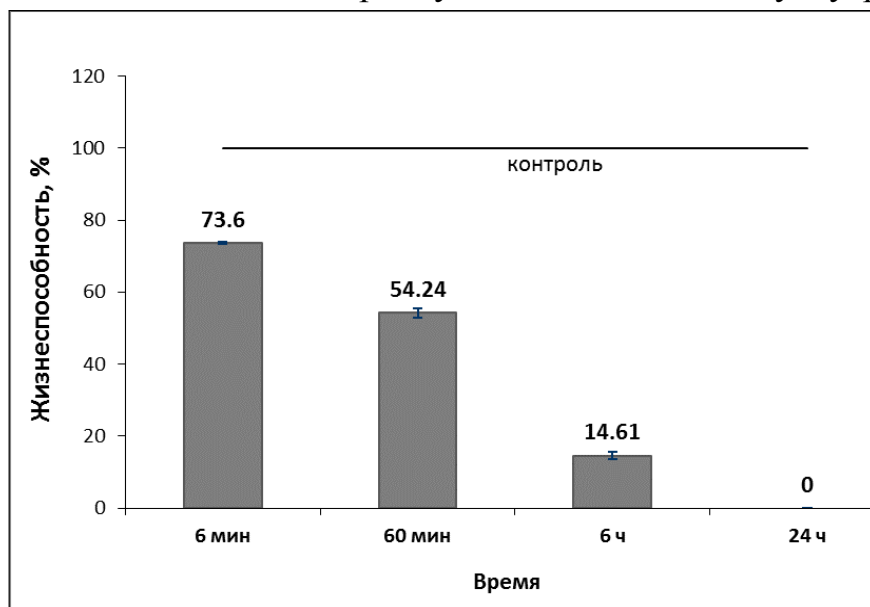


Рис. 8.  
Зависимость  
антивирусного  
действия 0.0001%  
«Бетадина» от  
продолжительность  
и инкубации

При исследовании действия «Бетадина» на *S.marcescens* наблюдали полную утрату жизнеспособности бактериальной суспензии при контакте с 10% «Бетадином» и его водным раствором, содержащим 1% повидон-йода. Снижение содержания повидон-йода до 0.1 – 0.0001% за счет разбавления «Бетадина» водой приводило к сохранению жизнеспособности бактериальной суспензии, которая, соответственно, находилась в пределах 1-50% от исходной величины (рис. 9 А). Добавление в среду Трис-НСl буфера и, вследствие этого, изменение рН и ионной силы среды сопровождалось увеличением жизнеспособности бактерий в 3.5-12 раз (рис. 9 Б).

Увеличение времени инкубации с 15 сек до 30 мин дополнительно сокращало жизнеспособность суспензии в 1.6 раза, если содержание в среде повидон-йода составляло 0.0002-0.005%. Увеличение оптической плотности бактериальной суспензии сопровождалось пропорциональным снижением ее жизнеспособности при 15-секундном контакте с 0.02% «Бетадином». Установлена зависимость эффективности действия «Бетадина» от фазы роста культуры. Наибольшее подавление жизнеспособности - сокращение почти в 11 раз - наблюдалось под действием 0.02% «Бетадина» в стационарной фазе, наименьшее - почти в 4 раза - в лаг фазе. Жизнеспособность культура в экспоненциальной фазе или фазе отмирания сокращалась под действием 0.02% «Бетадин» в 6 или в 7 раз, соответственно.

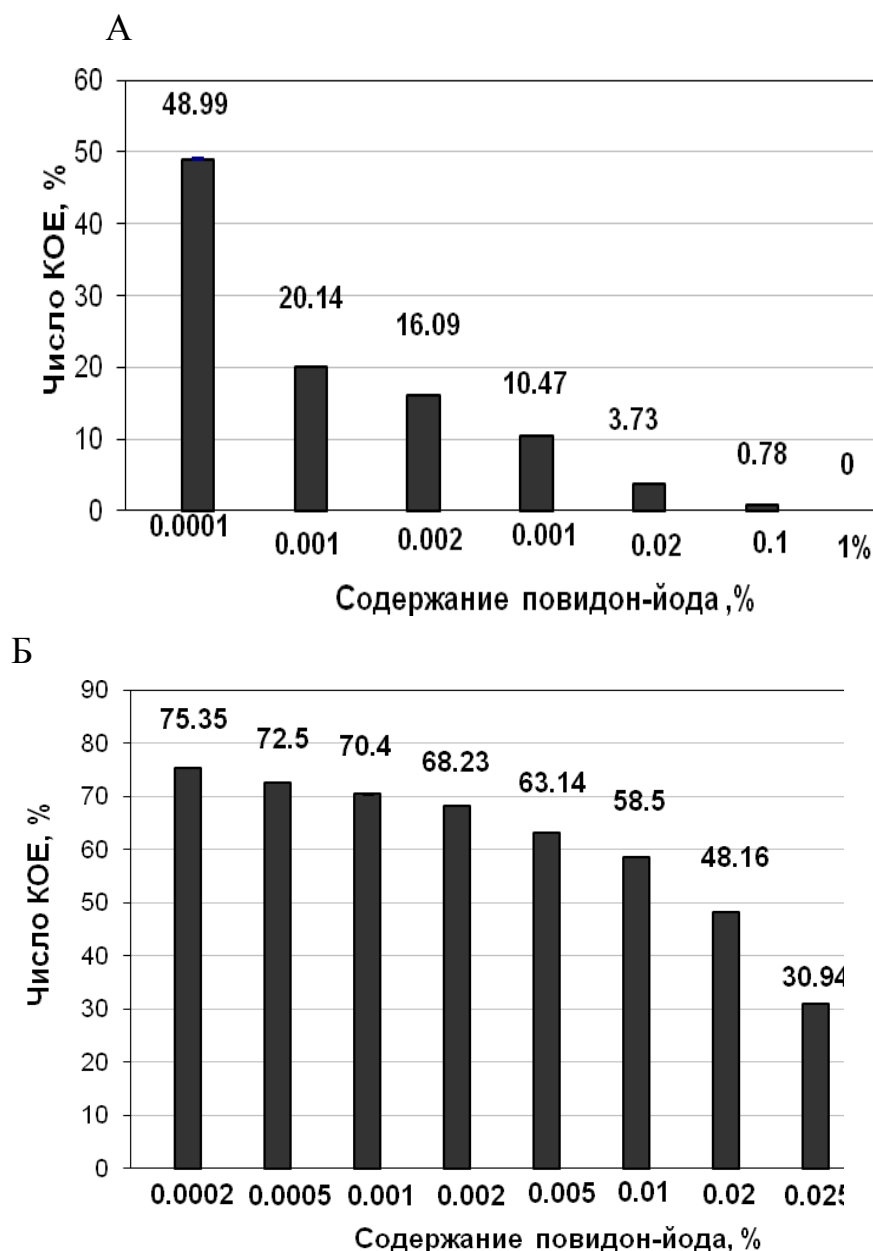


Рис. 9. Изменение жизнеспособности бактериальной суспензии *S. marcescens* под действием «Бетадина» в отсутствие (А) и в присутствии 0.2 М Трис-НСl буфера, рН 8.5, содержащего 0.02 М  $Mg^{2+}$  (Б)

Электронно-микроскопическое исследование выявило существенное изменение, как морфологии, так и ультраструктуры бактериальных клеток, возникающее под действием 15-секундной инкубации культуры 0.002%-ным «Бетадином». Так, в микробном материале появлялись клетки округлой формы с размытыми пограничными слоями. Местами наблюдалось отхождение цитоплазматической мембраны внутрь цитозоля (рис. 10). Область нуклеоида выглядела гетерогенной и внешним видом напоминала конденсированный хроматин, встречающийся при апоптозе клеток (рис. 11).



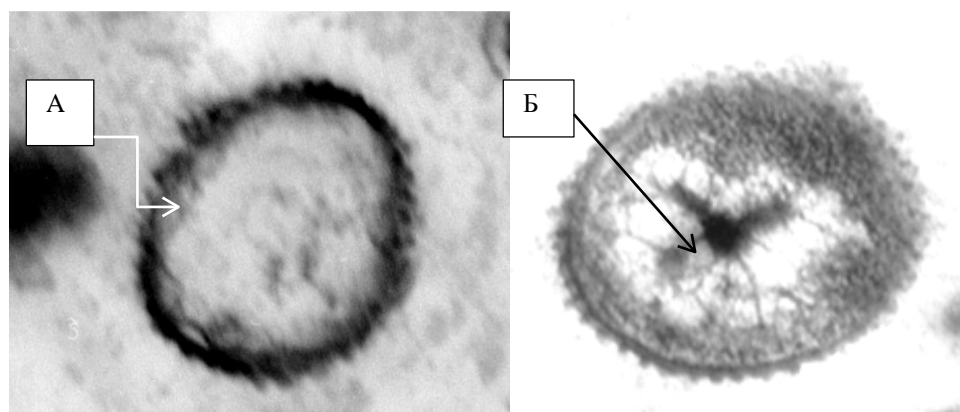


Рис. 10. Электронные фотографии ультраструктуры клеток *S.marcescens* после инкубации с «Бетадином». Отхождение цитоплазматической мембраны внутрь цитозоля (А); Гетерогенность нуклеоида (Б). Увеличение 40 (А) и 28 тыс. раз (Б).

Результаты анализа действия «Бетадина» на бактерии *B.subtilis* были аналогичны результатам для *S.marcescens*. Хотя снижение жизнеспособности бацилл под действием «Бетадина» было выражено слабее, установлена прямая зависимость эффективности действия «Бетадина» от концентрации повидон-йода (рис. 11). Одновременно показано, что присутствие в инкубационной среде 0.1 М Трис-НСI буфера, рН 8.5, содержащего 0.01 М  $Mg^{2+}$ , не оказывало существенного влияния на эффективность действия разбавленного «Бетадина» на суспензию *B. subtilis*.

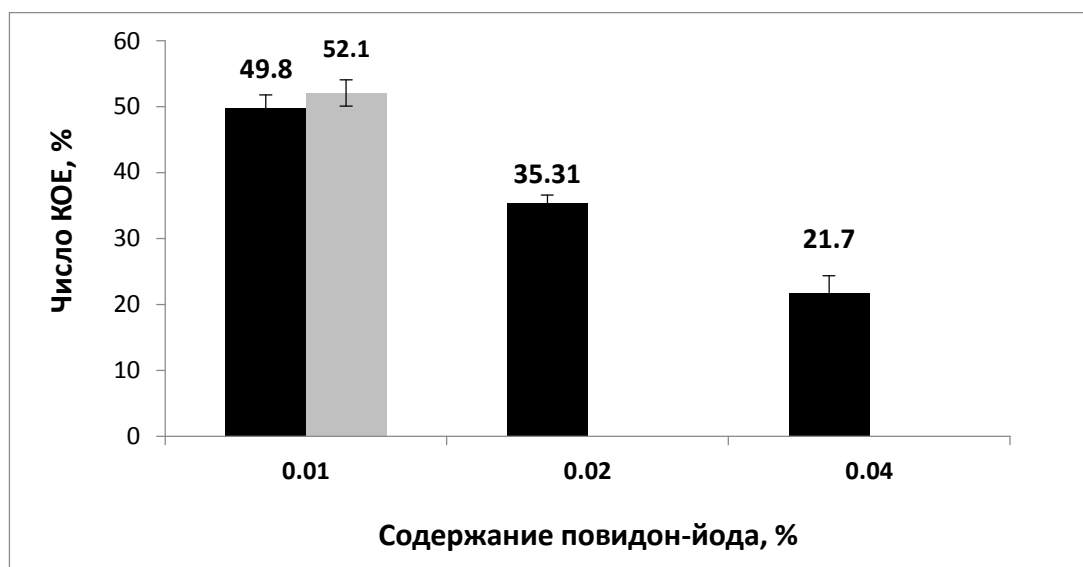


Рис. 11. Изменение жизнеспособности бактериальной суспензии *B. subtilis* под действием «Бетадина» в отсутствие ■ и в присутствии 0.1 М Трис-НСI буфера, рН 8.5, содержащего 0.01 М  $Mg^{2+}$  ■

Исследование действия «Бетадина» на *S.cerevisiae* показало, что в отличие от грамотрицательных бактерий и вирусов 15-секундный прямой контакт не только с 10-1%, но и 0.1% раствором «Бетадина» приводил к полной утрате жизнеспособности клеточной суспензии (рис. 12). Уменьшение

в 500 - 1000 раз содержания повидон-йода в водном растворе «Бетадина» по сравнению с исходным препаратом приводило к частичному сохранению жизнеспособности суспензии. При этом увеличение времени инкубации в 10-20 раз не оказывало влияния на эффективность действия растворов.

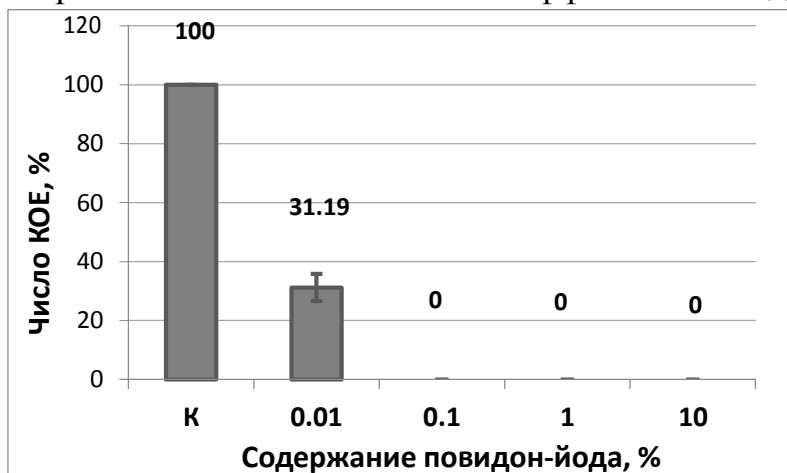


Рис. 12. Изменение жизнеспособности суспензии *S. cerevisiae* под действием «Бетадина»

Анализ действия разбавленного «Бетадина» на культуру клеток гепатомы показал, что в целом демонстрируя чувствительность к действию «Бетадина», клетки проявляли и большую устойчивость по сравнению с про- и низшими эукариотами. Так, при контакте с 1% «Бетадином» жизнеспособность культуры частично сохранялась. Около 3% клеток имели слабую или остаточную флюоресценцию зеленого цвета (рис. 13 Б), представляя, таким образом, поврежденные и живые клетки: соответственно  $2.4 \pm 0.4$  % и  $0.5 \pm 0$  % от общего числа. А под действием «Бетадина», содержащего 0.005% повидон-йода, количество живых клеток по сравнению с исходной культурой сокращалось в 1.3 раза, процент мертвых и поврежденных клеток увеличивался в 3 и 10 раз, соответственно. И в препарате среди клеток флюоресцирующих зеленым (рис. 13 А) с затемненной областью ядерного материала (1) встречались клетки, у которых область ядра ярко флюоресцировала красным (2), а также структуры без протопласта (3), очевидно, представляющие собой клеточные ядра, окрашенные пропидий-йодидом.

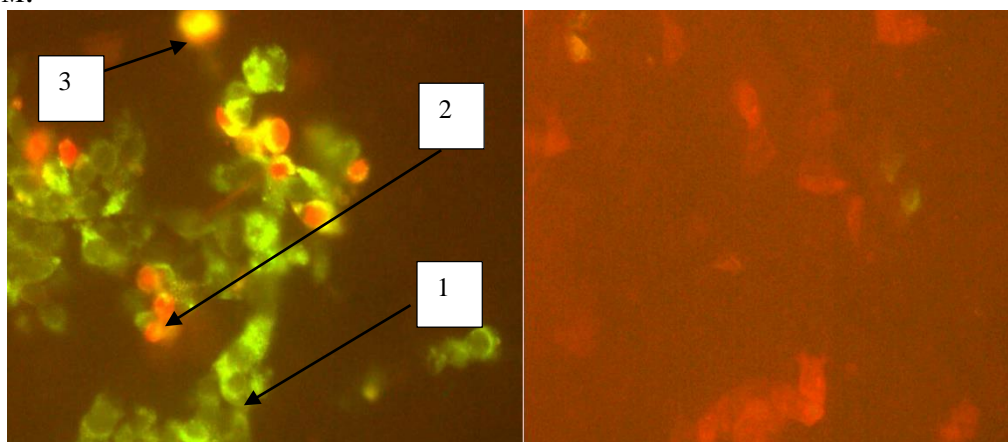


Рис. 13. Культура клеток гепатомы после контакта с 0.005% (А) или 1% повидон-йодом (Б), окрашенная в системе «живой/мертвый»

### 3. Определение эффективности действия эндонуклеазы в комбинации с «Бетадином»

Поскольку известно, что йод и йодсодержащие соединения негативно влияют на конформацию и каталитическую активность белков (Alps R. Povidone Iodine Antiseptic Agent. USA, 2004. P. 7-26.), исследовали изменение активности эндонуклеазы под действием «Бетадина». Установлено, что 3- или 6- минутная инкубация водного раствора эндонуклеазы с 10% «Бетадином» уменьшала ДНКазную активность, соответственно, на 30- или 70 %, независимо от типа исследуемой изоформы или присутствия в среде 0.1 М Трис-HCl буфера, pH 8.5, содержавшего 0.01M MgSO<sub>4</sub>.

При определении эффективности действия эндонуклеазы в комбинации с «Бетадином» условия комбинированного воздействия выбирались на основании результатов, представленных выше. При определении комбинированного действия на вирусы сначала смешивали в равных частях водный раствор «Бетадина» и буферный раствор эндонуклеазы, затем добавляли равный объем вирусной суспензии, и через 6 мин инкубации определяли снижение жизнеспособности. Установлено, что под действием комбинированного препарата жизнеспособность фаговой суспензии уменьшалась на 10%, по сравнению с раствором эндонуклеазы, и на 23% по сравнению с раствором «Бетадина» (рис.14).

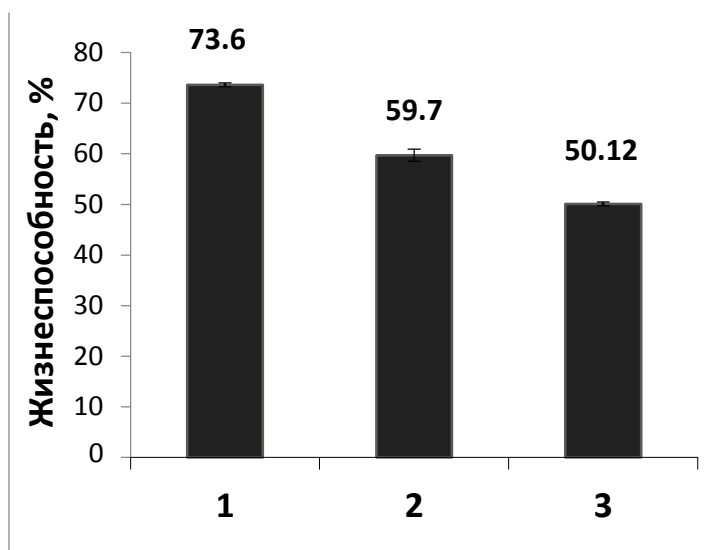


Рис. 14. Изменение жизнеспособности вирусной суспензии под действием водного раствора 0.0001% «Бетадина» (1), буферного раствора эндонуклеазы с активностью 10000 Ед./мл (2), и комбинированного препарата, полученного их смешиванием в равных частях (3)

Результатом сочетанного действия растворов «Бетадина» и эндонуклеазы на бактерии *B. subtilis* было увеличение эффективности действия эндонуклеазы почти в 2 раза, а «Бетадина» в 1.2-1.3 раза. Дальнейшее увеличение активности эндонуклеазы практически не влияло на полученный результат (рис. 15).

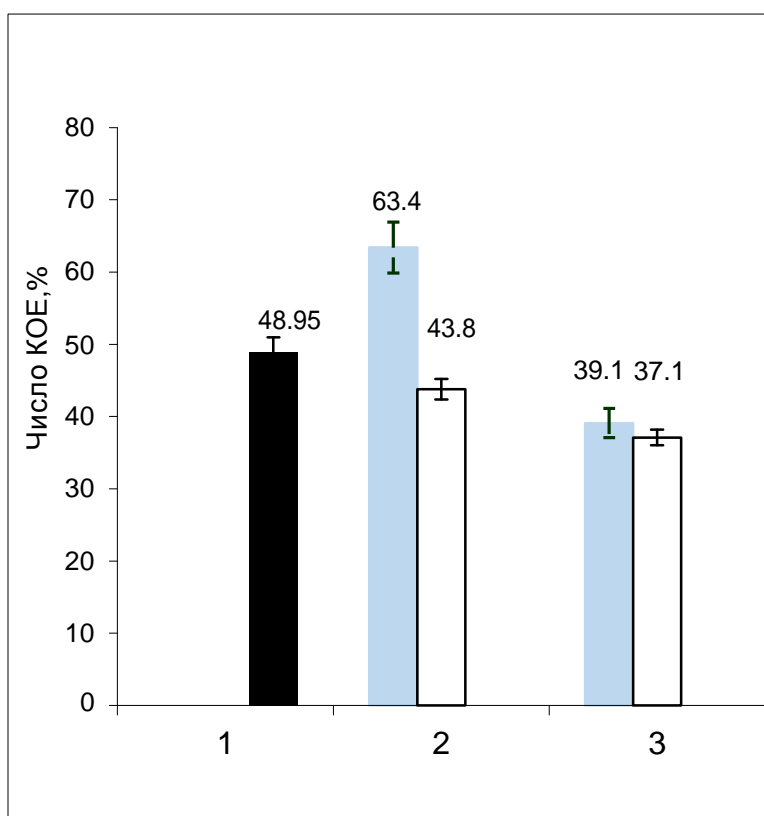


Рис. 15. Изменение жизнеспособности бактериальной суспензии *B. subtilis* под действием буферного раствора «Бетадина», содержащего 0.01% повидон-йода (1), буферных растворов эндонуклеазы (2) с активностью 11 440 Ед./мл или 1144 Ед./мл и комбинированных препаратов, полученных их смешиванием в равных частях (3)

Хотя усиление подавления жизнеспособности бактерии *S. marcescens* под действием комбинированного препарата наблюдалось лишь тогда, когда исходная концентрации повидон-йода в разбавленном «Бетадине» была не ниже 0.025% (рис. 16), исследование изменения морфологии и ультраструктуры клеток *S. marcescens* под действием эндонуклеазы в комбинации с 0.002% «Бетадином», показало, что (рис. 17). микробный материал в преобладающем большинстве содержал клетки с искаженной формой: изогнутые, округлые, - а также структуры, напоминающие фрагменты клеток. Довольно часто встречались структуры, напоминающие клетки со «шлейфом», позволяющие предположить вытекание протопласта. В большинстве случаев наблюдалась практически полная утрата границ между периплазмой, цитоплазмой, клеточной стенкой, цитоплазматической мембраной (1) и областью нуклеоида (2), в результате чего клетки представляли собой смесь бессистемно расположенных фрагментов различной электронной плотности. Такой результат позволил констатировать сочетанное действие «Бетадина» и эндонуклеазы, что послужило косвенным свидетельством попадания эндонуклеазы внутрь поврежденных клеток.

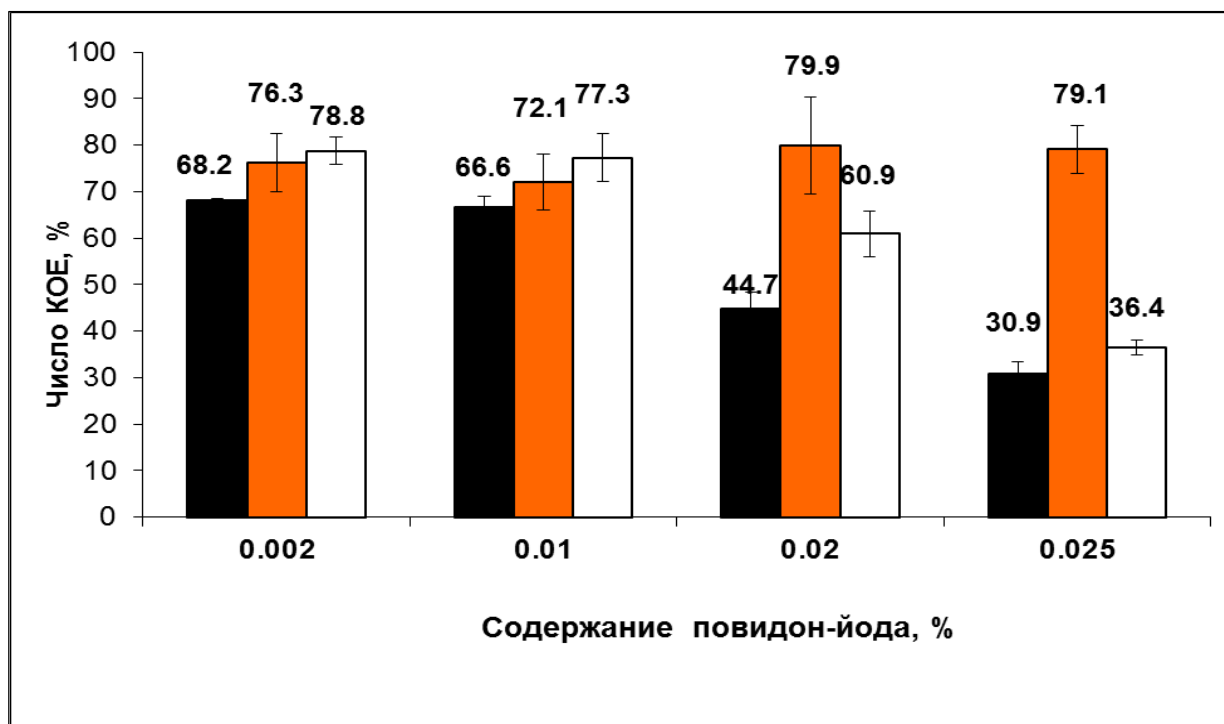


Рис. 16. Изменение жизнеспособности бактериальной суспензии *S. marcescens* под действием буферных растворов «Бетадина», содержание повидон-йода в которых составляло 0.002% - 0.025 % ■, буферного раствора эндонуклеазы с активностью 6384 Ед./мл ■ и комбинированных препаратов, полученных их смешиванием в равных частях □

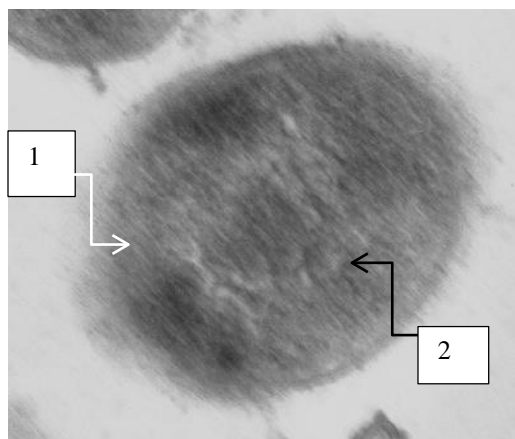


Рис. 17. Электронная фотография ультраструктуры клеток *S. marcescens* после инкубации с «Бетадином», содержащим 0.002% повидон-йода и последующей инкубацией с эндонуклеазой. Увеличение 40 тыс. раз. Полная утрата границ между периплазмой, цитоплазмой, клеточной стенкой, цитоплазматической мембраной (1) и областью нуклеоида (2)

Показано, что под действием предварительной инкубации суспензии *S. cerevisiae* в присутствии «Бетадина» эффективность действия эндонуклеазы возрастала. Об этом свидетельствовало уменьшение жизнеспособности, соответственно, в 2 и 3 раза, по сравнению с изменениями – под действием буферных растворов эндонуклеазы или «Бетадина», взятых по отдельности. Изменение содержания фермента в среде, что подтверждалось повышением ферментативной активности, или времени инкубации с эндонуклеазой не оказывало существенного влияния на результат (рис.18).

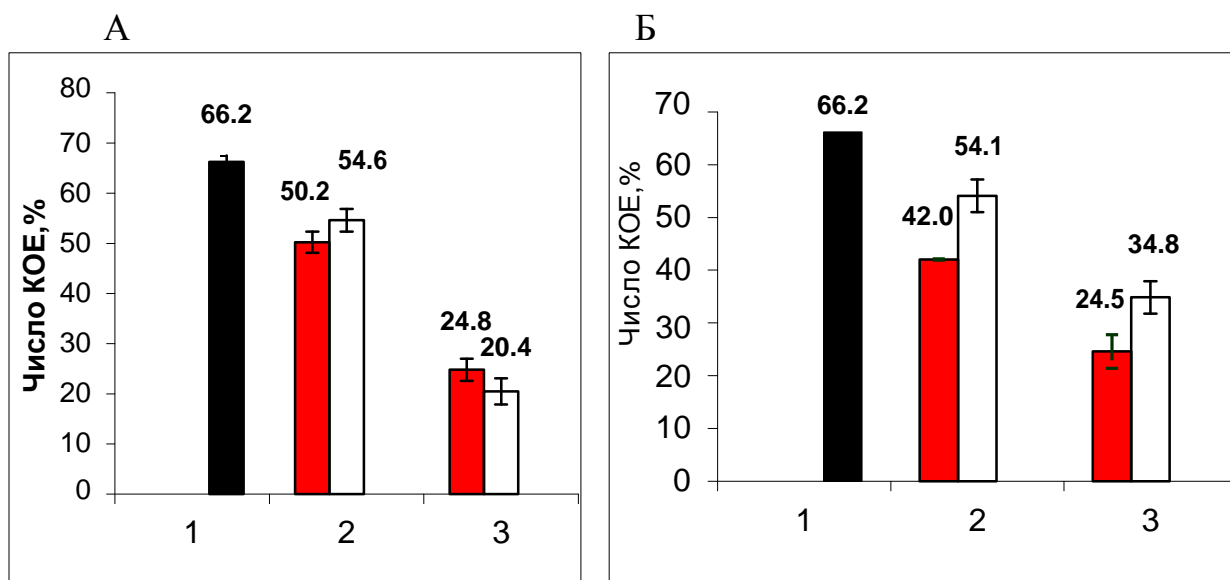


Рис. 19. Изменение жизнеспособности клеточной суспензии *S. cerevisiae* под действием водного раствора «Бетадина» (1), буферных растворов эндонуклеазы (2) с активностью 1144 Ед./мл □ и 5720 Ед./мл ■ и их последовательно сочетанного действия (3). Время инкубации с эндонуклеазой 15 мин (А) и 30 мин (Б)

Анализ действия эндонуклеазы в комбинации с «Бетадином» показал, что в результате контакта культуры клеток со смесью буферного раствора эндонуклеазы и разбавленного «Бетадина» происходило ослабление цитотоксического действия «Бетадина». Напротив, при последовательно сочетанном действии растворов «Бетадина» и эндонуклеазы, эффективность повреждающего действия возрастала. Так, в результате прямого 6-минутного контакта культуры клеток с «Бетадином», содержащим 0.005% повидон - йода, и последующего контакта с буферным раствором эндонуклеазы количество мертвых клеток достоверно увеличивалось, что свидетельствовало о снижении жизнеспособности культуры клеток (рис. 20). А в результате сочетанного действия раствора «Бетадина», содержавшего 1% повидон-йода, и буферного раствора эндонуклеазы с активностью 1288 Ед./мл, удавалось достичь полной утраты жизнеспособности культуры клеток (4).



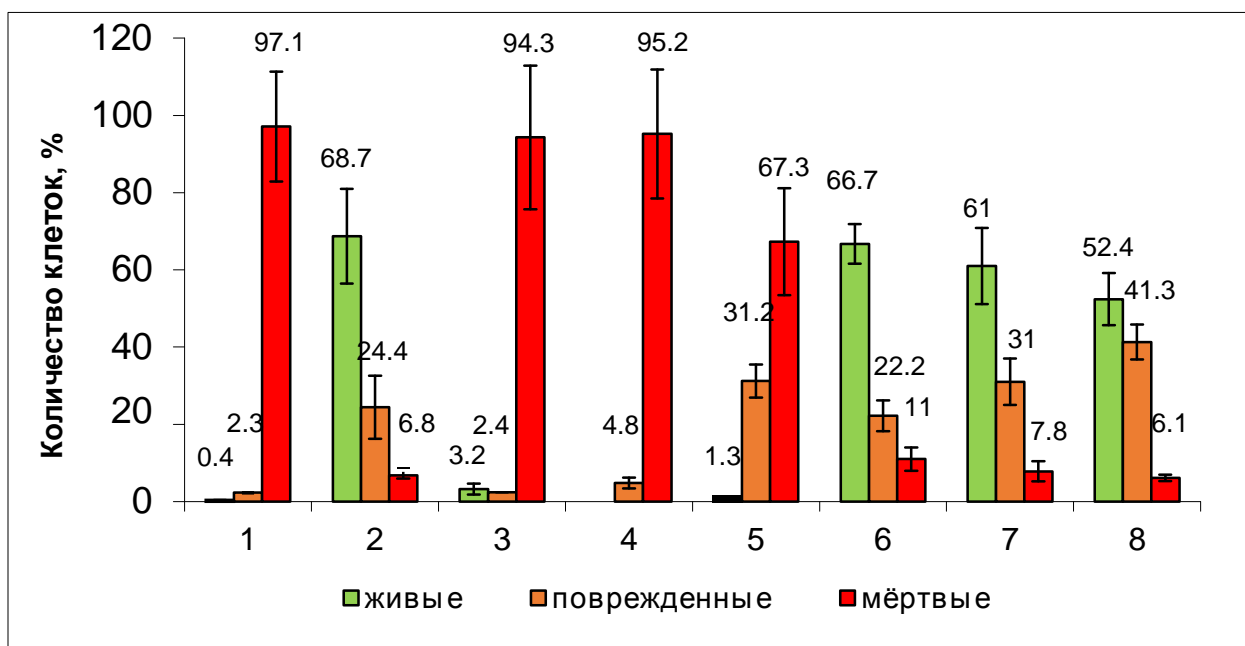


Рис. 20. Изменение жизнеспособности культуры клеток гепатомы Н4-П-Е-С3 под действием водных растворов «Бетадина», содержание повидон-йода в которых составляло 1% (1) или 0.005 % (2), и **последовательно сочетанного** действия этих растворов (3-5 и 6-8, соответственно) с буферными растворами эндонуклеазы, активность которых составляла 6440 Ед./мл (3, 6), 1288 Ед./мл (4, 7) или 12.88 Ед./мл (5, 8)

Таким образом, исследование комбинирования эндонуклеазы грамотрицательных бактерий *S.marcescens* с «Бетадином» - веществ относящихся к разным классам соединений – позволило создать принципиально новую композицию, под действием которой с высокой эффективностью и широким спектром действия происходило снижение жизнеспособности организмов относящихся к разным таксономическим группам и серьезно отличающихся друг от друга уровнем организации.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что эндонуклеаза грамотрицательных бактерий *S. marcescens*, представленная смесью мономеров изоформ Sm1 и Sm2, в концентрации не ниже 5 нМ способна в прямом 20-минутном контакте оказывать подавляющее действие на жизнеспособность микроорганизмов, принадлежащих к группе энтеробактерий, грамположительных зубактерий, дрожжей и вирусов.
2. Эффективность действия растворов «Бетадина» с содержанием повидон-йода 0.1- 0.0001% зависит не только от таксономической принадлежности объектов исследования, но и от длительности контакта с вирусной суспензией, а также фазы роста бактерий и плотности бактериальной суспензии.

3. Изменение жизнеспособности бактериальной суспензии *S. marcescens* под действием раствора «Бетадина», содержащего 0.002% повидон-йода, связано с изменением морфологии и ультраструктуры клеток, проявляющимся нарушениями мембранных структур, цитоплазмы и ядерного материала.
4. «Бетадин» подавляет активность эндонуклеазы *S. marcescens*, величина подавляющего эффекта зависит от концентрации раствора «Бетадина», времени контакта с эндонуклеазой и присутствия в инкубационной среде 0.1 М Трис-HCl буфера, pH 8.5, который препятствует уменьшению ферментативной активности.
5. Комбинирование с йодоформом «Бетадин» увеличивает эффективность действия эндонуклеазы на организмы, принадлежащие к различным таксономическим группам, и позволяет достичь полного подавления жизнеспособности вирусов и культуры клеток гепатомы Н4-П-Е-С3.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Зайнутдинова Э. Ф. Анализ действия «Повидон-йода» на бактерии *Serratia marcescens* / Э. Ф. Зайнутдинова, М. Н. Филимонова. // Ученые зап. Казан. Ун-та. Сер. Естеств. науки. - 2012. - Т. 154, кн.4.- С. 151-157. – (перечень ВАК), автора – 0.62 пл.
2. Зайнутдинова Э. Ф. Средство защиты против бактерий *Serratia marcescens* / Г. М. Галиева, Э. Ф. Зайнутдинова, М. Н. Филимонова // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». Санитарная микробиология. - 2012. - №2 (8). - С. 50-53. – (перечень ВАК).
3. Зайнутдинова Э. Ф. Противовирусный эффект эндонуклеазы в комбинации с «Бетадином» / Э. Ф. Зайнутдинова, И. О. Рассохина, М. Н. Филимонова // Ученые зап. Казан. Ун-та. Сер. Естеств. науки. - 2013. - Т. 155, кн.3. (перечень ВАК), автора – 0.62 пл.
4. Патент № 243136 РФ. Антивирусный препарат контактного действия на основе «Бетадина» и эндонуклеазы: пат. № 243136 РФ С 2 МПК А 61 К С 12 N9 2 2423136 RU / Филимонова М. Н., Зайнутдинова Э. Ф., Рассохина И. А.; заявитель и патентообладатель Филимонова М. Н., ГОУВПО «КГУ им. В. И. Ленина»; заявлено 10.10. 2010, Бюл № 28.; опубликовано 10.07.2011, Бюл № 19. – 7 с.
5. Zainutdinova E. F. Influence of povidon-iodine on microorganisms of different groups / E F. Zainutdinova, I. O. Rassohina, M. N. Filimonova // Abstracts of First Interuniversity Conference on Modern Biology «BioNews 2008» Kazan: 2008. – P. 37.
6. Зайнутдинова Э. Ф. Структурная организация молекул эндонуклеазы *Serratia marcescens* в растворах / Материалы X Научной конференции



молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского университета «Материалы и технологии XXI века». - Казань: 2011. - С.150.

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 д.б.н., проф. Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. E-mail автора: [ziabramova@mail.ru](mailto:ziabramova@mail.ru)